

## 明 細 書

## 血管炎治療剤

## 技術分野

本発明は、血管炎の新規な予防及び／又は治療剤に関する。

## 背景技術

血管炎は自己免疫疾患に共通に認められる難治性病態の一つであり、従来から用いられているステロイド剤や免疫抑制剤による治療に抵抗性を示す例も多く、新しい治療法の確立が望まれている。血管炎症候群は種々のサイズの動脈に炎症を生じ、発熱や筋肉・関節の疼痛、血管閉塞や皮膚潰瘍、多発性単神経炎を生じる。血管炎には、結節性多発性動脈炎や大動脈炎症候群などの難治性血管炎症候群が含まれる。結節性多発性動脈炎の病変は中膜と外膜の部分的な壊死性炎症により特徴付けられ、大動脈炎は通常、大動脈の3層すべて、すなわち内膜、中膜、外膜が炎症を呈する。

大動脈炎は、高安動脈炎とも呼ばれる。血管炎の病態にIL-6の関与が示唆されている。例えば、Noris et al.によると、病態が活性期にある高安動脈炎の患者においては、健常人に比較して血清中のIL-6濃度が増加していることが報告されている（Circulation, 1999 Jul 6;100(1):55-60）。しかし、同文献では、同時期にある患者では、ケモカインの一種であるRANTESの血清中濃度も高くなっていることが報告されている。また、Norisらはこれらのサイトカインが高安動脈炎患者における血管損傷（vasculitic lesion）を引き起こしている可能性を示唆する。

## 発明の開示

しかしながら、文献中には、IL-6の阻害による高安動脈炎の治療可能性については一切開示していない。従って、本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分とする動脈炎の予防及び／治療剤を提供する。

本発明者らは鋭意研究の結果、IL-6が血管炎の病態形成に不可欠であり、IL-6アンタゴニストが血管炎の治療効果を有することを明らかにした。さらに驚くべきことに、本発明者らの研究により、血管炎においてIL-6受容体抗体によりIL-6が受容体に結合するのを阻害したところ、血中でIL-6そのものが低化することが認められた。すなわち、IL-6阻害治療は血管炎に対して抗炎症作用を有するのみならず、血管炎の根本に作用して血管炎そのものを治療することが明らかとなった。

従って、本発明は、インターロイキン-6（IL-6）アンタゴニストを有効成分として含んで成る血管炎の予防及び／又は治療剤を提供する。

本発明はまた、インターロイキン-6（IL-6）アンタゴニストを有効成分として含んで成る、ステロイド剤及び／又は免疫抑制剤に抵抗を有する血管炎の予防及び／又は治療剤を提供する。

前記血管炎は、例えば結節性多発性動脈炎、大動脈炎症候群又は免疫異常に伴う血管炎である。大動脈炎症候群は、高安動脈炎とも呼ばれる。免疫異常に伴う血管炎として、例えば、リウマチに伴う血管炎や全身性エリテマトーデス（SLE）に伴う血管炎が挙げられる。

前記IL-6アンタゴニストは、例えばIL-6に対する抗体又はIL-6受容体に対する抗体であり、好ましくはIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である。前記IL-6受容体に対する抗体は、特に好ましく

は、ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体、例えばPM-1抗体であり、あるいはマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体、例えばMR16-1抗体である。前記IL-6受容体に対する抗体は、好ましくは組換え型抗体である。

前記IL-6受容体に対する抗体は、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体であることが出来る。本発明において特に好ましい抗体は、ヒト型化PM-1抗体である。

本発明はまた、下記の形態をとることが出来る。

(1) 血管炎の予防及び／又は治療剤の製造のためのインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストの使用。

(2) ステロイド剤及び／又は免疫抑制剤に抵抗を有する血管炎の予防及び／又は治療剤の製造のためのインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストの使用。

(3) 前記血管炎が結節性多発性動脈炎である、前記(1)又は(2)に記載の使用。

(4) 前記血管炎が大動脈炎症候群である、前記(1)又は(2)に記載の使用。

(5) 前記血管炎が免疫異常に伴う血管炎である、前記(1)又は(2)に記載の使用。

(6) 前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、前記(1)～(5)のいずれかに記載の使用。

(7) 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記(6)に記載の使用。

(8) 前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記(6)に記載の使用。

(9) 前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記(6)に記載の使用。

(10) 前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、前記(6)～(9)のいずれかに記載の使用。

(11) 前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、前記(8)に記載の使用。

(12) 前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、前記(9)に記載の使用。

(13) 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、前記(6)～(12)のいずれか1項に記載使用。

(14) 前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、前記(13)に記載の使用。

(15) インターロイキン-6(IL-6)アンタゴニストを投与することを含んで成る、血管炎の予防及び／又は治療方法。

(16) インターロイキン-6(IL-6)アンタゴニストを投与することを含んで成る、ステロイド剤及び／又は免疫抑制剤に抵抗を有する血管炎の予防及び／又は治療方法。

(17) 前記血管炎が結節性多発性動脈炎である、前記(15)又は(16)に記載の方法。

(18) 前記血管炎が大動脈炎症候群である、前記(15)又は(16)に記載の方法。

(19) 前記血管炎が免疫異常に伴う血管炎である、前記(15)又は(16)に記載の方法。

(20) 前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、前記(15)～(19)のいずれかに記載の方法。

(21) 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記(20)に記載の方法。

(22) 前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモ

ノクローナル抗体である、前記（20）に記載の方法。

（23）前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記（20）に記載の方法。

（24）前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、前記（20）～（23）のいずれかに記載の方法。

（25）前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、前記（22）に記載の方法。

（26）前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、前記（23）に記載の方法。

（27）前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、前記（20）～（26）のいずれかに記載の方法。

（28）前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、前記（27）に記載の方法。

#### 図面の簡単な説明

図1は、血管炎症候群のヒト型化IL-6R抗体療法における、CTの結果を示す写真であり、上部矢印は上行大動脈、下部矢印は下行大動脈を示す。

図2は、血管炎症候群のヒト型化IL-6R抗体療法における、CTの結果を示す写真であり、矢印は大動脈弓を示す。

図3は、血管炎症候群のヒト型化IL-6R抗体療法における、CTの結果を示す写真であり、上部矢印は上行大動脈、下部矢印は下行大動脈を示す。

図4は、血管炎症候群のヒト型化IL-6R抗体療法における、CTの結果を示す写真であり、上部矢印は上行大動脈、下部矢印は下行大動脈を示す。

図 5 は、血管炎症候群のヒト型化 IL-6R 抗体療法における、CT の結果を示す写真であり、矢印は大動脈弓を示す。

図 6 は、血管炎症候群のヒト型化 IL-6R 抗体療法における、CT の結果を示す写真であり、上部矢印は上行大動脈、下部矢印は下行大動脈を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

IL-6 は B 細胞刺激因子 2 (BSF2) あるいはインターフェロン  $\beta$  2 とも呼称されたサイトカインである。IL-6 は、B リンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。IL-6 は、T リンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258)。

IL-6 は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6 が結合する分子量約 80kD のリガンド結合性蛋白質の IL-6 受容体である (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828)。IL-6 受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性 IL-6 受容体としても存在する。

もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約 130kD の膜蛋白質 gp130 である。IL-6 と IL-6 受容体は IL-6 / IL-6 受容体複合体を形成し、次いで gp130 と結合することにより、IL-6 の生物学的活性が細胞内に伝達される (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581)。

IL-6アンタゴニストは、IL-6の生物学的活性の伝達を阻害する物質である。これまでに、IL-6に対する抗体（抗IL-6抗体）、IL-6受容体に対する抗体（抗IL-6受容体抗体）、gp130 に対する抗体（抗gp130 抗体）、IL-6改変体、IL-6又はIL-6受容体部分ペプチド等が知られている。

抗IL-6受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある（Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号W0 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2694767、米国特許番号US 5 21628）。その一つであるマウス抗体PM-1（Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906）の相捕性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている（国際特許出願公開番号W0 92-19759）。

前記IL-6アンタゴニストは、好ましくはIL-6受容体に対する抗体であり、好ましくはヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体又はマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である。上記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体としてはPM-1抗体が例示され、またマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体としてはMR16-1抗体が挙げられる。前記の抗体は、好ましくは、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体であり、例えばヒト型化PM-1抗体である。

本発明で使用するIL-6アンタゴニストは、血管炎の予防又は治療剤の活性成分として有用なものであれば、その由来、種類および形状を問わない。

IL-6アンタゴニストは、IL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストは、好

ましくはIL-6、IL-6受容体及びgp130 のいずれかの結合に対する阻害作用を有する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、例えば抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130 抗体、IL-6改変体、可溶性IL-6受容体改変体あるいはIL-6又はIL-6受容体の部分ペプチドおよび、これらと同様の活性を示す低分子物質が挙げられる。

本発明で使用する抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用する抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) やSK2 抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

抗IL-6抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550、J. Immunol. (1988) 140, 153



4-1541、あるいはAgr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688 に開示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1抗体 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7 抗体あるいはAUK146-15 抗体 (国際特許出願公開番号W0 92-19759)などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、平成元年7月12日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、MR

16-1 抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、Rat-mouse hybridoma MR1 6-1として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、平成9年3月13日に、FERM BP-5875としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

抗IL-6受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。IL-6受容体蛋白質は、本発明で用いられる抗IL-6受容体抗体の作製の感作抗原として使用されうる限り、いずれのIL-6受容体を使用してもよい。

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当

な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2Rを含有する大腸菌(E.coli)は、平成元年(1989年)1月9日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、HB101-pIBIBSF2Rとして、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明で使用する抗gp130抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用する抗gp130抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130と結合することにより、IL-6/IL-6受容体複合体のgp130への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、AM64抗体(特開平3-219894)、4B11抗体および2H4抗体(US 5571513)B-S12抗体およびB-P8抗体(特開平8-291199)などが挙げられる。

抗gp130モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細

胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130は、欧州特許出願公開番号EP 411946に開示されたgp130遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

gp130の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のgp130蛋白質を公知の方法で精製し、この精製gp130受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130を発現している細胞やgp130蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞

が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1~10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000～6000 程度のPEG 溶液を通常、30～60 % (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の実験希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原蛋白質又は抗原発現細胞で感作し、感作B リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W0 93/12227、W0 92/03918、W0 94/02602、W0 94/25585、W0 96/34096、W0 96/33735 参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の実験培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、平成元年7月12日に、FERM BP-2998としてブタペスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM培地（GIBCO-BRL製）、PFHM-II培地（GIBCO-BRL製）等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larriek J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法

(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987)162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的



として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体、ヒト (human) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V 領域をコードするDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 125023 、国際特許出願公開番号W0 92-19759 参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラPM-1抗体のL 鎖およびH 鎖のV 領域をコードするDNA を含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (グレートブリテン及び北部アイルランド連合王国 スコットランド アバディーン AB2 1RY マックハードライブ通り 23) に、1991年2 月12日に、各々NCIMB 40366 及びNCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023 、国際特許出願公開番号W0 92-19759 参照)。

具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (FR; framework region) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト

抗体C 領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号W0 92-19759 参照）。

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C 領域が使用される。ヒト抗体C 領域としては、C $\gamma$ が挙げられ、例えば、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3 又は C $\gamma$ 4 を使用することができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C 領域を修飾してもよい。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC 領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC' 領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号W0 92-19759 参照）。

また、ヒト抗体の取得方法としては先に述べた方法のほか、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することもできる。選択さ

れたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列をを適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、W0 92/01047, W0 92/20791, W0 93/06213, W0 93/11236, W0 93/19172, W0 95/01438, W0 95/15388を参考にすることができる。

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1  $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法（Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546 ; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法（Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043）に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383）を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド（refold）して使用する（例えば、W096/30394を参照）。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を

用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivo にて抗体を産生してもよい。

一方、in vivo の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系などがある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciensのようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacumに感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のようにin vitro又はin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) 又は軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号W0 94-11523 参照)。

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり

、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。

具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリナーを介して連結される（Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリナーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖又は、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖又は、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリナー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライ

マー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNA が作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sepharose F.F.等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で正在されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用する抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマト



グラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC (High performance liquid chromatography) に適用し得る。また、逆相HPLC (reverse phase HPLC) を用いてもよい。

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6 ) で 1  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAG製) 100  $\mu$ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100  $\mu$ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

本発明で使用されるIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR 法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。

IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、W0 96-18648、W096-17869に開示されている。

本発明で使用するIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10～80、好ましくは20～50、より好ましくは20～40個のアミノ酸残基からなる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わ

る領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。

具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明 廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 $\alpha$ -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの $\alpha$ -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応をする。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体からの切断をしペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られ

る。一方、Fmoc法では、例えばTFA 中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応を行うことができる。

得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水- アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マスマスペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

IL-6部分ペプチド及びIL-6受容体部分ペプチドの具体例は、特開平2-188600、特開平7-324097、特開平8-311098及び米国特許公報US 5210075に開示されている。

本発明で使用するIL-6アンタゴニストのIL-6シグナル伝達阻害活性は、通常用いられる方法により評価することができる。具体的には、IL-6依存性ヒト骨髓腫株（S6B45，KPMM2）、ヒトレンネルトTリンパ腫細胞株KT3、あるいはIL-6依存性細胞MH60.BSF2を培養し、これにIL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを共存させることによりIL-6依存性細胞の<sup>3</sup>H-チミジン取込みを測定すればよい。

また、IL-6受容体発現細胞であるU266を培養し、<sup>125</sup>I 標識IL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを加えることにより、IL-6受容体発現細胞に結合した<sup>125</sup>I 標識IL-6を測定する。上記アッセイ系において、IL-6アンタゴニストを存在させる群に加えIL-6アンタゴニストを含まない陰性コントロール群をおき、両者で得られた結果を比較すればIL-6アンタゴニストのIL-6阻害活性を評価することができる。

後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体により、血管

炎の治療効果が認められたことから、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは血管炎の治療剤として有用であることが示唆された。

本発明における治療対象は哺乳動物である。治療対象の哺乳動物は、好ましくはヒトである。

本発明の血管炎の予防又は治療剤は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1 mgから20 mg、好ましくは2 mgから8 mgの投与量を選ぶことができる。

好ましい投与量、投与方法は、たとえば抗IL-6レセプター抗体の場合には、血中にフリーの抗体が存在する程度の量が有効投与量であり、具体的な例としては、体重1 kgあたり1ヶ月（4週間）に1 mgから20 mg、好ましくは2 mgから8 mgを1回から数回に分けて、例えば2回／週、1回／週、1回／2週、1回／4週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与方法などである。投与スケジュールは、病状の観察および血液検査値の動向を観察しながら2回／週あるいは1回／週から1回／2週、1回／3週、1回／4週のように投与間隔を延ばしていくなど調整することも可能である。

本発明の血管炎の予防又は治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カル

ボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

## 実施例

以下、実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

### 実施例 1. 臨床試験

#### 方法：

従来の治療法に抵抗性の難治性血管炎症候群（結節性多発性動脈炎、大動脈炎症候群）患者を対象にヒト化抗IL-6レセプター抗体による治療を行った。大阪大学附属病院先進医療審査会の許可の下に、2例の患者にヒト化抗IL-6レセプター抗体であるヒト型化PM-1抗体（MRA）を使用した。エンドポイントは、磁気共鳴画像（MRI）、及びコンピューター断層撮影法（CT）を用いた画像評価の改善、皮膚症状の改善、C反応性蛋白（CRP）など炎症マーカーの改善、QOL（疼痛、関節痛、倦怠感）の改善とした。また、末梢血球、一般生化学、止血機能、IL-6、可溶性IL-6受容体、血中ヒト化抗IL-6レセプター抗体濃度、腫瘍壊死因子 $\alpha$ （TNF $\alpha$ ）、インターロイキン-1

b (IL-1b)、及び血管内皮増殖因子 (VEGF) の評価を行った。

結果：

症例 1.

19歳女性。平成8年に大動脈炎症候群と診断される。潰瘍性大腸炎の合併あり。プレドニゾロン (PSL) 60mg/日開始。シクロスポリンを併用するもPSL20mg/日以下に減量できず。平成10年、増悪に対しメチルプレドニゾロン (mPSL) パルス療法に加えシクロフォスファミド150mg/日を併用するもPSL 30mg以下への減量は困難。ベタメタゾン1mg/日を追加し、以後7回にわたって白血球除去療法を行うも無効。平成12年以降、mPSLパルス療法を間歇的に使用するとともに、アザチオプリン100mg/日、ミコフェノール酸モフェチル2g/日、メトトレキサート17.5mg/週の併用も無効であった。

図1～6に示すように、CTにて上行大動脈、大動脈弓3分岐、下行大動脈に著明な血管壁の肥厚が見られた。左鎖骨下動脈 (lt. SCA) に狭窄が認められた。CRP12.6 mg/dlと強い炎症を認め、強い持続性胸痛、1ヶ月で5kgの体重減少、意識消失発作を生じたため、MRA200mg/週を点滴静注使用した。約2週後にはCRPが陰性化。1ヵ月後には胸痛の改善に加え、図1～6に示すように、CT上で上行大動脈、大動脈弓3分岐、下行大動脈の血管壁における肥厚の改善および血管内腔の拡大が見られ、さらに頸動脈の血流の改善を認めた。また、便ヘモグロビンも陰性化し、潰瘍性大腸炎の症状も消失した。MRA治療中に血中TNF $\alpha$ の増加を認めたが、症状の悪化は認められなかった。大動脈壁の肥厚の改善および血管内腔の拡大は、MRA治療後2年経過時点においても維持されていた。高安動脈炎は別名、脈なし病ともよばれ、この患者でも当初は橈骨・尺骨動脈において脈をとることができなかったが、治療により橈骨・尺骨動脈の拍動が手首で触れるようになった。また、MRAの長期使用により、血中IL-

6は1720pg/mlから100pg/ml以下に低下した。

### 症例 2.

42歳男性。昭和61年に結節性動脈炎（皮膚型）を発症し、PSL、アザチオプリン、コルヒチン、抗凝固剤にて治療を行うも寛解・増悪を繰り返す。平成7年以降はmPSLパルス療法に加えシクロフォスファミドの併用も効果なく、平成9年より、アザチオプリン、シクロフォスファミド、γ-グロブリン大量療法、平成12年より、シクロフォスファミドパルス療法、白血球除去療法を行うも無効。血管炎に基づく皮膚潰瘍に対し植皮を行うも効果なく、悪化により右腓骨切除、さらには膝下切除を施行。さらに壊死性血管炎が悪化し、下肢の潰瘍も拡大傾向にあった。ヒト化抗IL-6レセプター抗体200mg/週による治療を開始後、それまで認めていた発熱や皮膚の紅斑、筋肉痛の改善を認めた。右大腿部での切断を余儀なくされたが、血中IL-6の低下に伴い白血球数も正常化し、その後は皮膚潰瘍の悪化を認めていない。

### 考察：

従来の治療ではコントロール不可能であった難治性の血管炎患者に対しMRAが有効であったことから、IL-6阻害治療は血管炎の新しい治療法となりうることを示された。このことはIL-6が血管炎の病態形成に不可欠であることを示す。また、いずれの症例においても治療経過中にIL-6そのものの低下を認めていることから、IL-6阻害治療は単に抗炎症作用ではなく血管炎の根本に作用していることが明らかとなった。

### 参考例 1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法（Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828）に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR法により可溶性IL-6受容体を作成



した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph I で消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18 (Amersham製) に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジェネシスシステム (Amersham製) により、PCR 法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345 の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO 細胞で発現するために、プラスミドpSV (Pharmacia製) と連結させ、プラスミドpSVL344 を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO 細胞発現プラスミドpECEdhfr344を得た。

10  $\mu$  g のプラスミドpECEdhfr344 をdhfr-CHO細胞株DXB-11 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) ヘカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO 細胞を1mM グルタミン、10% 透析FCS、100U/ml のペニシリンおよび 100  $\mu$  g/ml のストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含  $\alpha$  MEM 選択培養液で3 週間培養した。

選択されたCHO 細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一のCHO 細胞クローンを得た。このCHO 細胞クローンを20nM~200nM の濃度のメトトレキサートで増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO 細胞株5E27を得た。CHO 細胞株5E27を5%FBS を含むイスコーブ改変ダルベコ培養液 (IMDM、Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISA にて測定した。その結果、培養上清中には可溶性IL-6受容体が存在することが確認された。

## 参考例 2. 抗ヒト IL-6抗体の調製

10  $\mu$ g の組換え型 IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) をフロイント完全アジュバントとともに BALB/c マウスを免疫し、血清中に抗 IL-6 抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール 1500 を用いてミエローマ細胞株 P3U1 と融合させた。ハイブリドーマを HAT 培養液を用いる Oi らの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、抗ヒト IL-6 抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

抗ヒト IL-6 抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにして IL-6 結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の 96 穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を 0.1M の carbonate-hydrogen carbonate 緩衝液 (pH 9.6) 中で 100  $\mu$ l のヤギ抗マウス Ig (10  $\mu$ l/ml, Cooper Biomedical, Inc 製 Malvern, PA) により 4  $^{\circ}$ C で一晩コートした。次いで、プレートを 100  $\mu$ l の 1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS により室温で 2 時間処理した。

これを PBS で洗浄した後、100  $\mu$ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4  $^{\circ}$ C にて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/well となるように  $^{125}$ I 標識組換え型 IL-6 を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216 ハイブリドーマクローンのうち 32 のハイブリドーマクローンが IL-6 結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定な MH166.BSF2 が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗 IL-6 抗体 MH166 は IgG1  $\kappa$  のサブタイプを有する。

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH60.BSF2を用いてMH166抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH60.BSF2細胞を $1 \times 10^4$  /200  $\mu$  l /穴となるように分注し、これにMH166抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、0.5  $\mu$  Ci/ 穴の  $^3\text{H}$  チミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166抗体はIL-6により誘導されるMH60.BSF2細胞の $^3\text{H}$  チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

#### 参考例 3. 抗ヒトIL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (Hirata, Y. et al. J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) により作成した抗IL-6受容体抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6受容体 (Yamashiki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製), 10 mMトリエタノールアミン (pH 7.8) および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

BALB/cマウスを $3 \times 10^9$  個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマ

を作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。5 × 10<sup>7</sup> 個のU266細胞を<sup>35</sup>S-メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により<sup>35</sup>S-メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris (pH 7.4) で中和した。

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース (Pharmacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの<sup>35</sup>S 標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1 (FERM BP-2998)を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生される抗体は、IgG1 $\kappa$ のサブタイプを有する。

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45)、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により<sup>125</sup>I 標識した (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981)。

4 × 10<sup>5</sup> 個のU266細胞を1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清および14000cpmの<sup>125</sup>I 標識IL-6とともに培養した。70 $\mu$ lのサンプルを400 $\mu$ lのマイクロフュージポリエチレンチューブに300 $\mu$ lのFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受

容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

#### 参考例 4. 抗マウスIL-6受容体抗体の調製

Saito, T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173 に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を産生するCHO 細胞を10%FCSを含むIMDM培養液で培養し、その培養上清から抗マウスIL-6受容体抗体RS12（上記Saito, T. et al 参照）をAffigel 10ゲル（Biorad製）に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

得られたマウス可溶性IL-6受容体50  $\mu$ g をフロイント完全アジュバンドと混合し、ウイスターラットの腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラット脾臓細胞を採取し、 $2 \times 10^8$  個を $1 \times 10^7$  個のマウスミエローマ細胞P3U1と50%のPEG1500（Boehringer Mannheim 製）をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT 培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

ウサギ抗ラットIgG 抗体（Cappel製）をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgG によるELISA 法によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2 細胞（Matsuda, T. et al., J. Immunol

． (1988) 18, 951-956) を用いた  $^3\text{H}$  チミジンの取込みで調べた。  
96ウェルプレートにMH60.BSF2 細胞を  $1 \times 10^4$  個/ $200 \mu\text{l}$  /ウェル  
となるように調製した。このプレートに  $10 \text{ pg/ml}$  のマウスIL-6とMR  
16-1抗体又はRS12抗体を  $12.3 \sim 1000 \text{ ng/ml}$  加えて  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  で44  
時間培養した後、 $1 \mu\text{Ci}$ /ウェルの  $^3\text{H}$  チミジンを加えた。4 時間  
後に  $^3\text{H}$  チミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60  
.BSF2 細胞の  $^3\text{H}$  チミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1 (FERM BP-5875)が産生する  
抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかと  
なった。

## 請 求 の 範 囲

1. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する血管炎の予防及び／又は治療剤。

2. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する、ステロイド剤及び／又は免疫抑制剤に抵抗性を有する血管炎の予防及び／又は治療剤。

3. 前記血管炎が結節性多発性動脈炎である、請求項 1 又は 2 に記載の予防及び／又は治療剤。

4. 前記血管炎が大動脈炎症候群である、請求項 1 又は 2 に記載の予防及び／又は治療剤。

5. 前記血管炎が免疫異常に伴う血管炎である、請求項 1 又は 2 に記載の予防及び／又は治療剤。

6. 前記 IL-6 アンタゴニストが IL-6 受容体に対する抗体である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の予防及び／又は治療剤。

7. 前記 IL-6 受容体に対する抗体が IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項 6 に記載の予防及び／又は治療剤。

8. 前記 IL-6 受容体に対する抗体がヒト IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項 6 に記載の予防及び／又は治療剤。

9. 前記 IL-6 受容体に対する抗体がマウス IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項 6 に記載の予防及び／又は治療剤。

10. 前記 IL-6 受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項 6 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の予防及び／又は治療剤。

11. 前記ヒト IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体が PM-1 抗体である、請求項 8 に記載の予防及び／又は治療剤。

12. 前記マウス IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体が MR16-1

抗体である、請求項 9 に記載の予防及び／又は治療剤。

13. 前記 IL-6 受容体に対する抗体が IL-6 受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項 6 ～12 のいずれか 1 項に記載の予防及び／又は治療剤。

14. 前記 IL-6 受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化 PM-1 抗体である、請求項 13 に記載の予防及び／又は治療剤。

15. 血管炎の予防及び／又は治療剤の製造のためのインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストの使用。

16. ステロイド剤及び／又は免疫抑制剤に抵抗性を有する血管炎の予防及び／又は治療剤の製造のためのインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストの使用。

17. 前記血管炎が結節性多発性動脈炎である、請求項 15 又は 16 に記載の使用。

18. 前記血管炎が大動脈炎症候群である、請求項 15 又は 16 に記載の使用。

19. 前記血管炎が免疫異常に伴う血管炎である、請求項 15 又は 16 に記載の使用。

20. 前記 IL-6 アンタゴニストが IL-6 受容体に対する抗体である、請求項 15 ～19 のいずれか 1 項に記載の使用。

21. 前記 IL-6 受容体に対する抗体が IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項 20 に記載の使用。

22. 前記 IL-6 受容体に対する抗体がヒト IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項 20 に記載の使用。

23. 前記 IL-6 受容体に対する抗体がマウス IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項 20 に記載の使用。

24. 前記 IL-6 受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項 20 ～23 のいずれか 1 項に記載の使用。



25. 前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項22に記載の使用。

26. 前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項23に記載の使用。

27. 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項20～26のいずれか1項に記載の使用。

28. 前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、請求項27に記載の使用。

29. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを、投与を必要とする対象に投与することを含んで成る、血管炎の予防及び／又は治療方法。

30. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを、投与を必要とする対象に投与することを含んで成る、ステロイド剤及び／又は免疫抑制剤に抵抗性を有する血管炎の予防及び／又は治療方法。

31. 前記血管炎が結節性多発性動脈炎である、請求項29又は30に記載の方法。

32. 前記血管炎が大動脈炎症候群である、請求項29又は30に記載の方法。

33. 前記血管炎が免疫異常に伴う血管炎である、請求項29又は30に記載の方法。

34. 前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、請求項29～33のいずれか1項に記載の方法。

35. 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項34に記載の方法。

36. 前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項34に記載の方法。

37. 前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項34に記載の方法。

38. 前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項34～37のいずれか1項に記載の方法。

39. 前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項36に記載の方法。

40. 前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項37に記載の方法。

41. 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項34～40のいずれか1項に記載の方法。

42. 前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、請求項41に記載の方法。

Fig.1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4

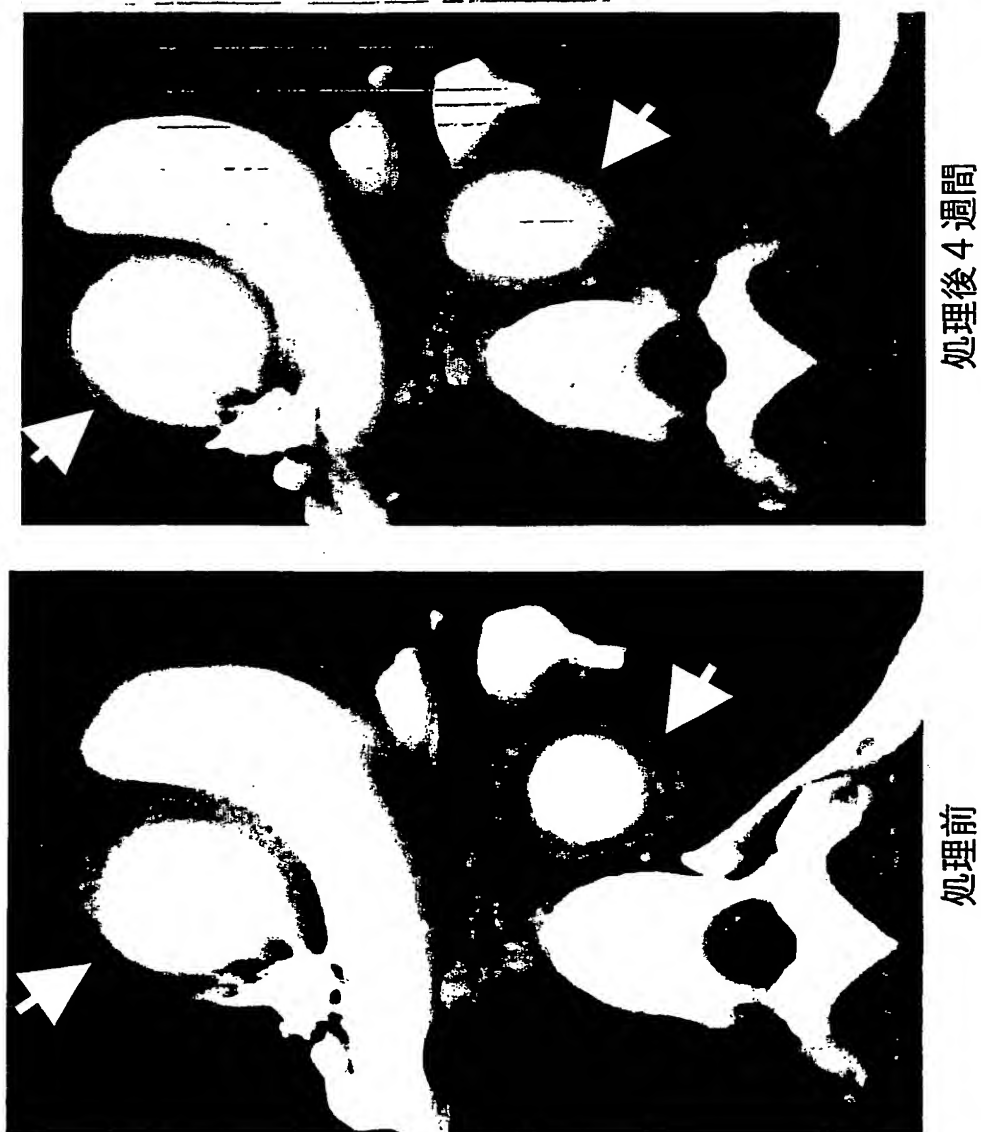


Fig. 5

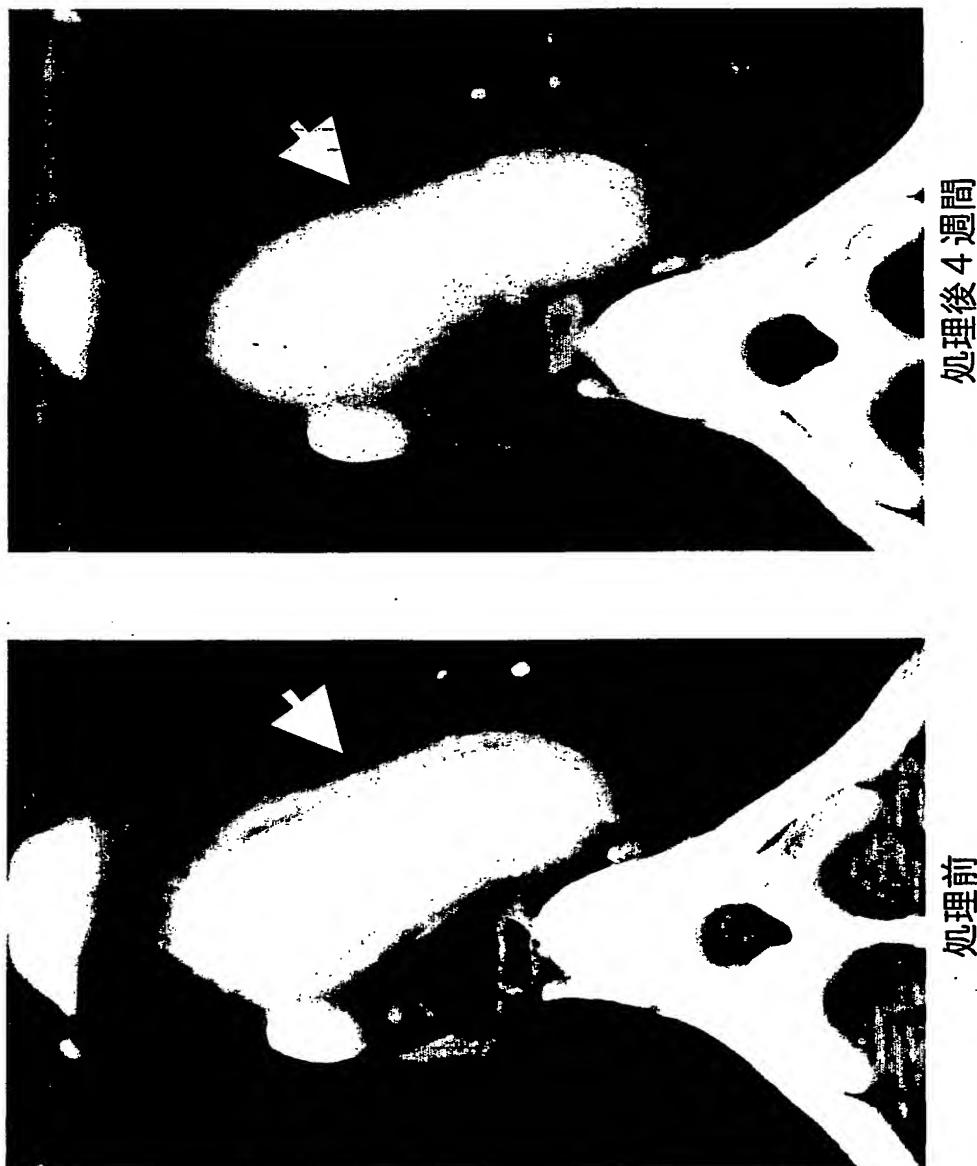
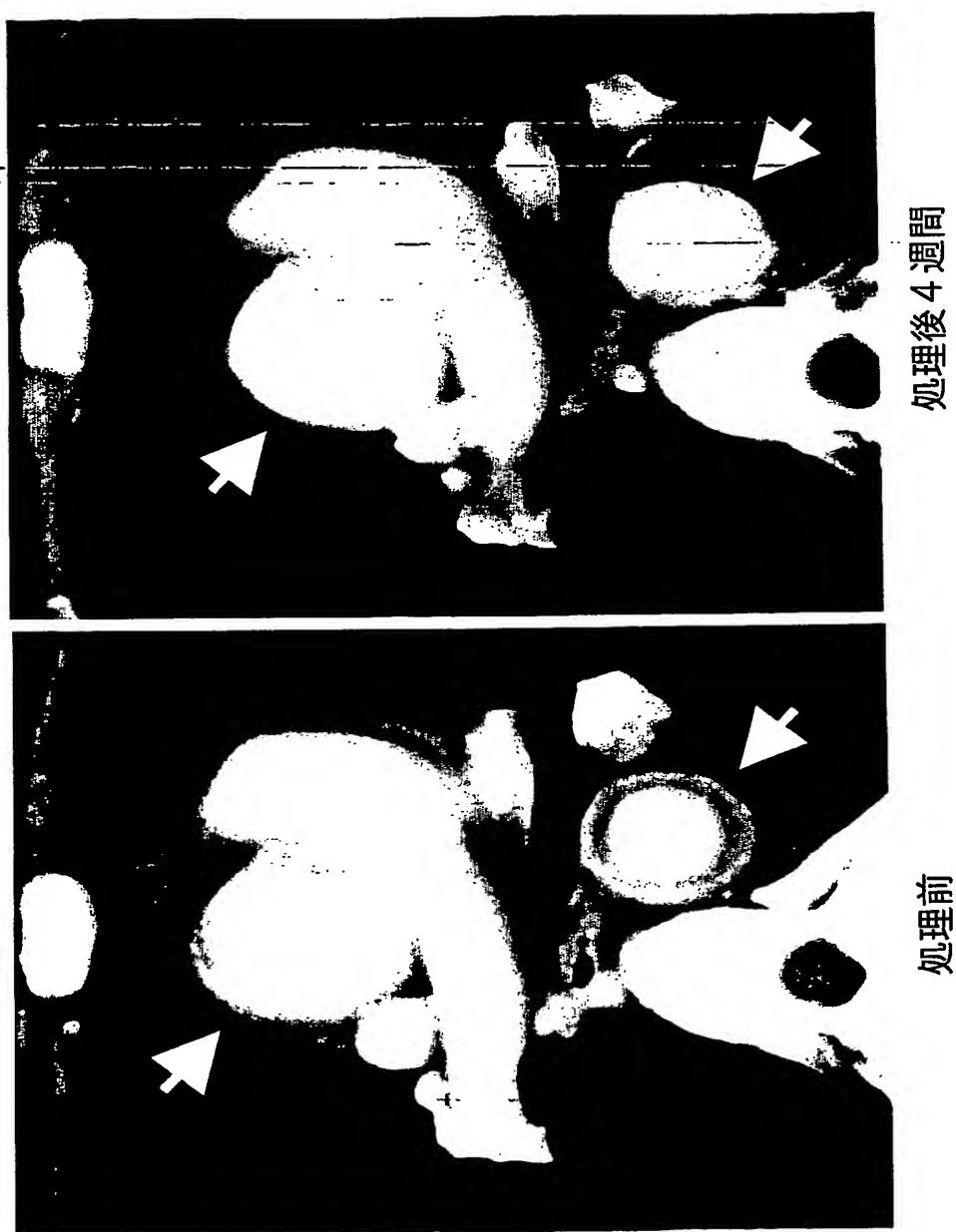


Fig. 6





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019463

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P29/00, 9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P29/00, 9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JSTPLUS (JOIS), JST7580 (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-26699 A (Intasaito Nanosaiensu Kabushiki Kaisha), 29 January, 2003 (29.01.03), Full text (Family: none)	1-5, 15-19 6-14, 20-28
X Y	Hiroshi HASHIMOTO, "ANCA Kanren Kekkan'en ni okeru Byotai to Cytokine tonu Kanren ni Tsuitenno Kento", Nanchisei Kekkan'en ni Kansuru Chosa Kenkyu, Heisei 13 Nendo Sokatsu Kenkyu Hokokusho, 2003, pages 47 to 55, full text	1-5, 15-19 6-14, 20-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 January, 2005 (21.01.05)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019463

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Shunsei HIROHATA, Elevation of Cerebrospinal Fluid Interleukin-6 Activity in Patients with Vasculitides and Central Nervous System Involvement, 1993, Vol.66, No.3, pages 225 to 229, full text	1-5,15-19 6-14,20-28
X Y	NORIS Marina, Interleukin-6 and RANTES in Takayasu Arteritis: A Guide for Therapeutic Decisions?, Circulation, 1999, Vol.100, pages 55 to 60, full text	1-5,15-19 6-14,20-28
Y	Norihiro NISHIMOTO, "Kinmirai no Chiryoho - Ko-Cytokine Ryoho o Chushin ni", Medicina, 2001, Vol.38, No.3, pages 441 to 445, [RA no Men'eki Ijo Byotai]	5,19
Y	Ryuji KOIKE, "Zenshinsei Erythematsus no Rinshozo", Medicina, 1998, Vol.35, No.10, pages 1728 to 1730, [Seishin Shinkei Shojo]	5,19
Y	JP 10-324639 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 December, 1998 (08.12.98), Full text & WO 98/42377 A1 & EP 983767 A1	6-14,20-28

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/019463

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29—42

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 29 to 42 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019463

## <Subject of search>

Claims 1 to 5 and 15 to 19 relate to a remedy for angitis comprising, as the active ingredient, a compound defined by a desired property "an interleukin-6 (IL-6) antagonist" or a method of using such a compound for producing a remedy. Although claims 1 to 5 and 15 to 19 involve any compounds having this property, it is recognized that only small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the compounds being "an interleukin-6 (IL-6) antagonist" cannot be specified. Thus, claims 1 to 5 and 15 to 19 do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6, too.

Such being the case, the search was made on the relationship between an interleukin-6 (IL-6) antagonist and angitis and remedies for angitis which comprise the compounds specifically presented in the description and specified in claims 6 to 14 and 20 to 28 as the active ingredient. Claims 6 to 14 and 20 to 28 were completely examined.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P29/00, 9/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P29/00, 9/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JSTPLUS (JOIS), JST7580 (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2003-26699 A (インターサイト・ナノサイエンス株式会社) 2003.01.29., 全文 (ファミリーなし)	1-5, 15-19 6-14, 20-28
X Y	橋本博史, ANCA関連血管炎における病態とサイトカインとの関連についての検討, 難治性血管炎に関する調査研究 平成13年度総括研究報告書, 2003, p.47-55, 全文	1-5, 15-19 6-14, 20-28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.01.2005

国際調査報告の発送日

08.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世

4 P

3436

電話番号 03-3581-1101 内線 3491

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	HIROHATA Shunsei, Elevation of Cerebrospinal Fluid Interleukin-6 Activity in Patients with Vasculitides and Central Nervous System Involvement, 1993, Vol.66, No.3, p.225-229, 全文	1-5, 15-19 6-14, 20-28
X Y	NORIS Marina, Interleukin-6 and RANTES in Takayasu Arteritis :A Guide for Therapeutic Decisions?, Circulation, 1999, Vol.100, p.55-60, 全文	1-5, 15-19 6-14, 20-28
Y	西本憲弘, 近未来の治療法—抗サイトカイン療法を中心に, Medicina, 2001, Vol.38, No.3, p.441-445, 「RAの免疫異常病態」の項	5, 19
Y	小池竜司, 全身性エリテマトーデスの臨床像, Medicina, 1998, Vol.35, No.10, p.1728-1730, 「精神神経症状」の項	5, 19
Y	JP 10-324639 A (中外製薬株式会社) 1998.12.08., 全文 & WO 98/42377 A1 & EP 983767 A1	6-14, 20-28

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29-42 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 29-42 は、治療による人体の処置方法であり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

＜調査の対象について＞

請求の範囲1-5、15-19は「インターロイキン-6（IL-6）アンタゴニスト」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする血管炎の治療剤、または、治療剤の製造のために該化合物を使用する方法に関するものである。そして、請求の範囲1-5、15-19は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第6条の意味において明細書に裏付けられ、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎないものと認められる。

また、「インターロイキン-6（IL-6）アンタゴニスト」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1-5、15-19は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、インターロイキン-6（IL-6）アンタゴニストと血管炎との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲6-14、20-28に特定されている化合物を有効成分とする血管炎治療剤について行った。また、請求の範囲6-14、20-28については、完全な調査を行った。